

**PCT**

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>G01N 33/543</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/34114</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. August 1998 (06.08.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/00403  (22) Internationales Anmeldedatum: 30. Januar 1997 (30.01.97)		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE).  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): DREMEL, Bernd [DE/DE]; Kölner Strasse 20, D-64293 Darmstadt (DE).  (74) Gemeinsamer Vertreter: MERCK PATENT GMBH; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE).			
<b>(54) Title: METHOD FOR THE IMMUNOLOGICAL DETERMINATION OF AN ANALYTE</b>			
<b>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR IMMUNOLOGISCHEN BESTIMMUNG EINES ANALYTEN</b>			
<b>(57) Abstract</b>  The invention concerns a method for the immunological determination of an analyte in a sample using magnetic particles coated with the analyte to be determined or analyte-specific bonding partners and directly detectable non-magnetic particles coated with analyte-specific bonding partners or the analyte to be determined or using a non-magnetic substance which is indirectly detectable, and incubation of the reaction mixture. The method is characterized in that the magnetic particles are subsequently separated from the reaction mixture using a magnetic test strip and the analyte concentration is determined directly.			
<b>(57) Zusammenfassung</b>  Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur immunologischen Bestimmung eines Analyten in einer Probe mit Hilfe von mit dem zu bestimmenden Analyten oder analytpezifischen Bindungspartnern beschichteten magnetischen Partikeln und mit analytpezifischen Bindungspartnern oder dem zu bestimmenden Analyten beschichteten, direkt nachweisbaren nicht-magnetischen Partikeln oder einer indirekt nachweisbaren nicht-magnetischen Substanz und Inkubation des Reaktionsgemisches. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß die magnetischen Partikel anschließend mit einem magnetischen Teststreifen aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt und die Analytkonzentration direkt bestimmt wird.			

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Amenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolci	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Verfahren zur immunologischen Bestimmung eines Analyten

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur immunologischen Bestimmung  
5 eines Analyten in einer Probelösung mit Hilfe von magnetischen und nicht-  
magnetischen Partikeln.

10 Immunologische Methoden zur Bestimmung von Analyten mit magneti-  
schen und nicht-magnetischen Partikeln sind z.B. aus WO 95/04279  
bekannt. Dabei werden nach der Inkubation die magnetischen Partikel  
durch ein magnetisches Feld in der Reaktionslösung niedergeschlagen; im  
Überstand wird dann der Analyt photometrisch bestimmt. In JP 05-52849  
ist ein chromatographisches System beschrieben, das mit einem Magne-  
ten versehen ist. Das kapillare Medium erfüllt dabei die Aufgabe eines  
15 Filters. Die treibende Kraft, die den Analyten durch das Filter bzw. die  
Kapillare zwingt, ist die magnetische Kraft.

20 Die bekannten Verfahren haben eine Reihe von Nachteilen. Die magne-  
tische Trennung der Partikel durch Niederschlagung in der Reaktions-  
lösung hat den Nachteil, daß ein direkter photometrischer, fluorimetrischer  
oder elektrochemischer Nachweis des Analyten nicht ohne weitere  
Wasch- oder Trennschritte möglich ist. Ein Mangel der Filtrationssysteme  
besteht darin, daß die Filter bzw. Kapillaren leicht verstopfen, Viskositäts-  
probleme auftreten und der Analyt vorzeitig auf dem chromatographischen  
25 Material, d.h. vor der Bindungsreaktion, adsorbiert wird, so daß nur  
ausgewähltes Probengut zuverlässig analysiert werden kann.

30 Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die geschilderten  
Nachteile bei immunologischen Verfahren, die mit magnetischen Partikeln  
arbeiten, zu vermeiden und ein ganz einfaches und zuverlässiges  
Verfahren zur Verfügung zu stellen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur immunologischen Bestimmung eines Analyten in einer Probe mit Hilfe von mit dem zu bestimmenden Analyten oder analytischen Bindungspartnern beschichteten magnetischen Partikeln und mit analytischen

5 Bindungspartnern oder dem zu bestimmenden Analyten beschichteten, direkt nachweisbaren nicht-magnetischen Partikeln oder einer indirekt nachweisbaren nicht-magnetischen Substanz und Inkubation des Reaktionsgemisches, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die magnetischen Partikel anschließend mit einem magnetischen Teststreifen aus 10 dem Reaktionsgemisch abgetrennt und die Analytkonzentration direkt bestimmt wird.

Vorzugsweise wird die Analytkonzentration direkt auf dem magnetischen Teststreifen visuell oder reflektometrisch bestimmt. Die Bestimmung kann 15 auch indirekt nach Entwickeln einer Farbreaktion oder elektrochemisch auf dem Teststreifen erfolgen.

Unter Analyt werden vor allem die diagnostisch relevanten Inhaltsstoffe von Körperflüssigkeiten, d.h. Haptene oder Antigene verstanden; unter 20 den analytischen Bindungspartnern sind monoklonale und polyklonale Antikörper zu verstehen.

Die magnetischen Teststreifen nach der Erfindung können z.B. ähnlich wie Disketten, Ton- oder Videobänder aus geeigneten magnetisierbaren 25 Pigmenten hergestellt werden. Vorzugsweise eignen sich sehr flache Permanentmagnete. Die Verwendung von Seltene-Erden-Metallelegierungen erlaubt die Herstellung von Permanentmagneten mit besonders hoher Remanenz. Im einfachsten Fall kann für das erfindungsgemäße 30 Verfahren ein flacher Dauermagnet verwendet werden, der vollständig mit weißem, glatten Karton umhüllt und mit Kunststoffklebstreifen an den Rändern verklebt wird. Der magnetische Teststreifen kann durch Abwischen der magnetischen Partikel von der glatten Oberfläche nach der Testdurchführung mehrfach verwendet werden.

Ein großer Vorteil der Magnetstreifentechnologie im Vergleich zur direkten klassischen Kopplung von Antikörpern an die Oberfläche von Teststreifen ist darin zu sehen, daß die Reaktion mit dem Analyten zunächst homogen bzw. quasi-homogen abläuft. Diffusionsprobleme, die den unteren Detektionsbereich bei heterogenen Reaktionen zwischen Teststreifen und Analyten einschränken, spielen im homogenen Milieu praktisch keine Rolle.

Umgekehrt werden bei heterogenen Reaktionen, die oft diffusionslimitiert sind, verschiedene Maßnahmen unternommen, den Stoffaustausch zwischen Reaktionsoberfläche und Analytlösung zu verbessern (Filtration des Analyten durch die Teststreifenoberfläche). Die mit diesen Maßnahmen erzielbaren Vorteile können jedoch nicht den Vorteil der quasi-homogenen Reaktion zwischen Analyten und kleinen suspendierten Partikeln mit hoher Oberfläche kompensieren (Probleme infolge von Porendiffusion, Clogging-Effekte).

Als Partikel können im Prinzip alle im Handel erhältlichen magnetischen und nicht-magnetischen Partikel, die auch farbig sein können, verwendet werden, sofern sie eine Größe von 30 nm bis 800 µm haben. Geeignete Partikel sind anorganische und organische Partikel, z.B. magnetische Partikel aus Eisen, Nickel, Cobalt, Mangan, Elementen der Lanthanidenreihe wie Neodym, Erbium usw., Partikel aus magnetischen Legierungen wie Aluminium-, Nickel-, Cobalt-, Kupferlegierungen, Oxide wie  $Fe_3O_4$ ,  $CrO_2$ ,  $CoO$ ,  $NiO_2$ ,  $Mn_2O_3$  usw., Kompositmaterialien wie Ferrite und organische Polymere wie Polystyrol.

Als erfindungsgemäße Verfahren ist vor allem zum Nachweis von Analyten geeignet, für die spezifischer Bindungspartner existiert. Die Durchführung erfolgt z.B. nach den bekannten Verfahren der Sandwich-Immunoassays oder der kompetitiven Immunoassays. Nach der Inkubation werden die magnetischen Partikel mit Hilfe des magnetischen Teststreifens abgetrennt, so daß die direkt nachweisbaren nicht-magnetischen Partikel bzw. die indirekt nachweisbare nicht-magnetische Substanz in der Reaktionsmischung zurückbleiben, sofern sie nicht an die magnetischen Partikel gebunden werden. Der Nachweis erfolgt auf der Oberfläche des Teststreifens entweder direkt optisch, z.B. durch die An- oder Abwesenheit

andersfarbiger nicht-magnetischer Partikel, oder indirekt, z.B. wenn die nicht-magnetische Substanz ein Enzym ist, nach dem Entwickeln einer Farbreaktion auf dem Teststreifen. Handelt es sich bei der nicht-magnetischen Substanz um ein Enzym, so kann der Nachweis auf dem 5 magnetischen Teststreifen auch elektrochemisch erfolgen. Bei dem Teststreifen handelt es sich dann um eine magnetische Elektrode.

Die direkte immunologische Bestimmung eines Analyten mit farbigen nicht-magnetischen Partikeln nach der Sandwich-Methode erfolgt z.B. so, 10 daß ein Monoreagenz mit der Probelösung inkubiert wird. Das Monoreagenz besteht aus magnetischen Partikeln, die mit analytischen vorzugsweise monoklonalen Antikörpern beschichtet sind und andersfarbigen nicht-magnetischen Partikeln, die ebenfalls mit vorzugsweise monoklonalen Antikörpern beschichtet sind, wobei diese Antikörper gegen 15 ein anderes Epitop des Analyten gerichtet sind. Die Partikel sind in einer geeigneten Pufferlösung suspendiert. Ist in der Probelösung der Analyt zugegen, so können die andersfarbigen nicht-magnetischen Partikel an die magnetischen Partikel binden. Nach Ablauf einer hinreichenden Reaktionszeit werden die magnetischen Partikel aus der Reaktions- 20 mischung mit einem magnetischen Teststreifen abgetrennt. Die an die Oberfläche des Teststreifens gebundenen magnetischen Partikel werden direkt visuell mittels einer Farbskala oder mit einem Reflektometer ausgewertet. Die Farbänderung auf dem Teststreifen hängt direkt von der Anzahl der gebundenen nicht-magnetischen andersfarbigen Partikel ab 25 und ist proportional zur Analytkonzentration. Zwei Wellenlängenmessungen können darüber hinaus Inhomogenitäten beim Aufziehen der magnetischen Partikel auf den Teststreifen ausgleichen.

Die immunologische Bestimmung nach der Methode des kompetitiven 30 Assays wird z.B. mit einem Bireagenz durchgeführt. Reagenz 1 enthält in einer geeigneten Pufferlösung magnetische Partikel, die mit analytischen (monoklonalen oder polyklonalen) Antikörpern beschichtet sind. Reagenz 2 enthält in der gleichen Pufferlösung andersfarbige nicht-magnetische Partikel, die mit dem zu bestimmenden Analyt beschichtet 35 sind. Die Probelösung wird zunächst mit dem Reagenz 1 inkubiert. Ist in

der Probelösung der Analyt vorhanden, so werden Bindungsstellen der analytischen Antikörper auf den magnetischen Partikeln entsprechend der Konzentration des Analyten in der Probe abgesättigt. Nach einer geeigneten Inkubationszeit wird das Reagenz 2 zur Reaktions-  
5 mischung gegeben. Die mit dem Analyten beschichteten andersfarbigen nicht-magnetischen Partikel können an die magnetischen Partikeln binden, sofern nicht die Bindungsstellen der Antikörper durch den Analyten bereits blockiert sind. Nach Ablauf einer bestimmten Reaktions-  
10 zeit werden die magnetischen Partikel aus der Reaktionsmischung mit dem erfindungsgemäßen magnetischen Teststreifen abgetrennt. Die an die Oberfläche des Teststreifens gebundenen magnetischen Partikel werden direkt visuell mittels einer Farbskala oder mit einem Reflektometer ausgewertet. Die Farbänderung auf dem Teststreifen hängt direkt von der Anzahl der gebundenen nicht-magnetischen andersfarbigen Partikel ab  
15 und ist umgekehrt proportional zur Analytkonzentration. Zwei Wellenlängenmessungen können darüber hinaus Inhomogenitäten bei dem Aufziehen der magnetischen Partikel auf den Teststreifen ausgleichen. Das Bireagenz kann auch so zusammengesetzt sein, daß die magnetischen Partikel mit dem Analyten beschichtet sind, und die nicht-magnetischen Partikel mit dem Antikörper; das Nachweisprinzip ist unverändert.  
20

Eine indirekte immunologische Bestimmung eines Analyten mit einer nicht-magnetischen Substanz, z.B. einem Enzym, nach der Sandwich-Methode kann wie folgt durchgeführt werden. Ein Monoreagenz, das in einer Puffer-  
25 lösung magnetische Partikel enthält, die mit einem analytischen, vorzugsweise monoklonalen Antikörpern beschichtet sind, sowie eine nicht-magnetische Substanz, vorzugsweise ein Enzym, das mit vorzugsweise monoklonalen Antikörpern gekoppelt ist, jedoch einen Antikörper enthält, der gegen ein anderes Epitop des Analyten gerichtet als die  
30 Antikörper auf den magnetischen Partikeln. Dieses Monoreagenz wird mit der Probelösung inkubiert. Ist Analyt in der Probe vorhanden, so bindet die nicht-magnetischen Substanz an die magnetischen Partikel. Nach Ablauf einer bestimmten Reaktionszeit werden die magnetischen Partikel aus der Reaktionsmischung mit einem magnetischen Teststreifen abgetrennt. Anschließend wird auf dem Teststreifen eine chemische  
35

Reaktion zum Nachweis der nicht-magnetischen Substanz durchgeführt. Handelt es sich bei der nicht-magnetischen Substanz um ein Enzym, so kann beispielsweise ein auf dem Teststreifen fixierter Leukofarbstoff enzymatisch in einen Farbstoff umgewandelt werden. Die Farbänderung auf dem Teststreifen kann direkt visuell mittels einer Farbskala oder mit einem Reflektometer ausgewertet werden. Sie ist proportional zur Analytkonzentration.

5

Geeignete Pufferlösungen sind solche, die in der Lage sind, einen pH-10 Bereich von 5 bis 9 aufrechtzuerhalten, wie Phosphatpuffer, Tris-, Borat-, HEPES-, PIPES-Puffer usw.

15 Beispiel 1

15 Bestimmung von Cortisol nach dem kompetitiven Assay

Reagenz 1: 50 mM Phosphatpufferlösung mit suspendierten magnetischen Partikeln, die mit anti-Cortisol-Antikörpern beschichtet sind.

20 Reagenz 2: 50 mM Phosphatpufferlösung mit an alkalische Phosphatase gekoppeltem Cortisol.

25 30 µl Probelösung (Serum) werden mit 150 µl Reagenz 1 3 Minuten vorinkubiert und anschließend weitere 3 Minuten mit 150 µl Reagenz 2 inkubiert. Durch kurzes Eintauchen des magnetischen Teststreifens in die Reaktionslösung (1 Minute) werden die suspendierten magnetischen Partikel an die Oberfläche des Teststreifens gebunden. Der Teststreifen wird anschließend für 1 Minute in die Substratlösung (para-Nitrophenyl-phosphatlösung) eingetaucht. Nach ca. 5 Minuten Reaktionszeit wird die Analytkonzentration qualitativ durch Farbvergleich mit einem Referenzteststreifen bestimmt.

30

35 Bei der Reaktion tritt ein Verdrängungswettbewerb zwischen dem gesamten Cortisol des Serums und dem mit alkalischer Phosphatase-markierten Cortisol ein. Die Menge an markiertem Cortisol, das auf den

Partikeln gebunden wird ist um so höher, je geringer die Menge an gesamtem Cortisol im Serum ist. Der Farbumschlag auf dem Teststreifen ist umgekehrt proportional zur Analytikonzentration.

5      Beispiel 2

Bestimmung von Ferritin

Reagenz 1: 0,2 M Tris-Pufferlösung mit suspendierten magnetischen Partikeln, die mit anti-Ferritin-Antikörpern beschichtet sind.

10      Reagenz 2: 0,2 M Tris-Pufferlösung mit an alkalische Phosphatase gekoppeltem Ferritin.

15      Die Bestimmung wird analog Beispiel 1 mit para-Nitrophenylphosphat als Substratlösung durchgeführt. Nach 4 Minuten Reaktionszeit wird die Ferritinkonzentration qualitativ durch Farbvergleich des magnetischen Teststreifens mit Referenzteststreifen bestimmt.

20      Beispiel 3

Bestimmung von TNT in Wasserproben

Das TNT-Reagenz besteht aus einer 50 mM Phosphatpufferlösung vom pH 7,4 mit suspendierten magnetischen Partikeln (100 µg/ml), die mit anti-TNT-Antikörpern (IgG1, Lot: 103726 von Fa. SDI) beschichtet sind (Reagenz 1), sowie einer gepufferten Kompetitionslösung (TNT-alkalische Phosphatase-Konjugat, Lot: 103881, Fa. SDI, 1:80 verdünnt in 50 mM TRIS-Puffer, pH 8,0, 0,15 M NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O, 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 30 2,5 % BSA, 5 % Saccharose, 0,1 % NaN<sub>3</sub> (Reagenz 2)).

100 µl Probe (TNT-Lösung in 40 mM HEPES-Puffer werden mit 150 µl Reagenz 1 2 Minuten vorinkubiert und anschließend weitere 2 Minuten mit 150 µl Reagenz 2 inkubiert. Durch Eintauchen des magnetischen Teststreifens in die Reaktionslösung (1 Minute) werden die suspendierten

Magnetpartikel an die Oberfläche des Teststreifens gebunden. Der Teststreifen wird anschließend für 1 Minute in eine Substratlösung (para-Nitrophenylsulfatlösung) eingetaucht. Nach weiteren 4 Minuten Reaktionszeit wird die Analytkonzentration qualitativ durch Farbvergleich mit dem

5 Referenzteststreifen bestimmt. Die Gesamtanalysezeit beträgt ca. 10 Minuten.

Bei der Reaktion tritt ein Verdrängungswettbewerb zwischen dem TNT der Wasserprobe und dem AP-markierten TNT ein. Die Menge an markiertem 10 TNT, das auf den Partikeln gebunden wird, ist um so höher, je geringer der TNT-Gehalt der Wasserprobe ist. Nach der Reaktion werden die magnetischen Partikel auf dem Teststreifen gebunden und in der Substratlösung inkubiert. Der Farbumschlag auf dem Teststreifen ist umgekehrt proportional zur Analytkonzentration.

15

20

25

30

35

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur immunologischen Bestimmung eines Analyten in einer Probe mit Hilfe von mit dem zu bestimmenden Analyten oder analytpezifischen Bindungspartnern beschichteten magnetischen Partikeln und mit analytpezifischen Bindungspartnern oder dem zu bestimmenden Analyten beschichteten, direkt nachweisbaren nicht-magnetischen Partikeln oder einer indirekt nachweisbaren nicht-magnetischen Substanz und Inkubation des Reaktionsgemisches, dadurch gekennzeichnet, daß die magnetischen Partikel anschließend mit einem magnetischen Teststreifen aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt und die Analytkonzentration direkt bestimmt wird.
- 15 2. Verfahren zur immunologischen Bestimmung eines Analyten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Analytkonzentration direkt auf dem magnetischen Teststreifen bestimmt wird.
- 20 3. Verfahren zur immunologischen Bestimmung eines Analyten nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Analytkonzentration indirekt nach Entwickeln einer Farbreaktion oder elektrochemisch bestimmt wird.

25

30

35

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/00403

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC
---

B. FIELDS SEARCHED
--------------------

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
---

IPC 6 G01N
------------

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
---

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
--

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
--

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 86 05815 A (GENETICS INTERNATIONAL INC.) 9 October 1986 see claims 1-27 ---	1-3
A	EP 0 297 290 A (MILES INC.) 4 January 1989 see claims; figures 1,2 ---	1-3
A	EP 0 170 446 A (SERONO DIAGNOSTICS LIMITED) 5 February 1986 see abstract; claims ---	1-3
A	EP 0 209 490 A (SERONO DIAGNOSTICS PARTNERS) 21 January 1987 ---	
E	DE 195 47 346 A (MERCK PATENT GMBH.) 26 June 1997 see the whole document -----	1-3

<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.
---

<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
--

* Special categories of cited documents :
---

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
---	--

1 October 1997	06.10.1997
----------------	------------

Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016
--

Authorized officer
--------------------

Griffith, G
-------------

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

Inte .onal Application No

PCT/EP 97/00403

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8605815 A	09-10-86	AU 5667186 A EP 0216844 A	23-10-86 08-04-87
EP 0297290 A	04-01-89	AU 584542 B AU 1749088 A DK 314388 A JP 1047954 A ZA 8802820 A	25-05-89 15-12-88 11-12-88 22-02-89 24-10-88
EP 0170446 A	05-02-86	AU 596946 B AU 4472685 A CA 1272507 A US 4978610 A	24-05-90 16-01-86 07-08-90 18-12-90
EP 0209490 A	21-01-87	CH 663476 A CA 1276596 A DE 3686967 A JP 7082016 B US 4793973 A	15-12-87 20-11-90 19-11-92 06-09-95 21-01-87 27-12-88
DE 19547346 A	26-06-97	NONE	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 97/00403

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 G01N33/543

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfobjekt (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfobjekt gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 86 05815 A (GENETICS INTERNATIONAL INC.) 9.Oktober 1986 siehe Ansprüche 1-27 ---	1-3
A	EP 0 297 290 A (MILES INC.) 4.Januar 1989 siehe Ansprüche; Abbildungen 1,2 ---	1-3
A	EP 0 170 446 A (SERONO DIAGNOSTICS LIMITED) 5.Februar 1986 siehe Zusammenfassung; Ansprüche ---	1-3
A	EP 0 209 490 A (SERONO DIAGNOSTICS PARTNERS) 21.Januar 1987 ---	
E	DE 195 47 346 A (MERCK PATENT GMBH.) 26.Juni 1997 siehe das ganze Dokument -----	1-3

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"g" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

2

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
1. Oktober 1997	06.10.1997
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Griffith, G

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur seßen Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/00403

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 8605815 A	09-10-86	AU 5667186 A EP 0216844 A	23-10-86 08-04-87
EP 0297290 A	04-01-89	AU 584542 B AU 1749088 A DK 314388 A JP 1047954 A ZA 8802820 A	25-05-89 15-12-88 11-12-88 22-02-89 24-10-88
EP 0170446 A	05-02-86	AU 596946 B AU 4472685 A CA 1272507 A US 4978610 A	24-05-90 16-01-86 07-08-90 18-12-90
EP 0209490 A	21-01-87	CH 663476 A CA 1276596 A DE 3686967 A JP 7082016 B JP 62012858 A US 4793973 A	15-12-87 20-11-90 19-11-92 06-09-95 21-01-87 27-12-88
DE 19547346 A	26-06-97	KEINE	